



TITLE:

1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する新規低酸素誘導因子(HIF)阻害薬に関する研究(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

安田, 順信

CITATION:

安田, 順信. 1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する新規低酸素誘導因子(HIF)阻害薬に関する研究. 京都大学, 2015, 博士(薬科学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18927>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により全文は2021-09-01に公開; 許諾条件により要約は2016-03-22に公開; 許諾条件により要旨は2015-06-22に公開

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	安田 順信
論文題目	1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する新規低酸素誘導因子 (HIF)阻害薬に関する研究		

(論文内容の要旨)

がん細胞は特異なエネルギー代謝能を獲得することで、腫瘍内部の低酸素・低栄養下でも増殖することが知られている。がんの悪性化には転写因子である低酸素誘導因子(hypoxia inducible factor-1: HIF-1)が中心的な役割を果たしていることから、HIF-1 はがん治療に対する創薬標的として近年注目を集めている。そこで著者は新規 HIF-1 阻害薬開発を目的に、ケミカルライブラリーを用いた探索、構造活性相関研究、ならびに作用機序に関する研究を行った。

第一章 新規 HIF-1 阻害化合物のスクリーニング

新たなケモタイプを有した HIF-1 阻害化合物を探索するため、京都大学大学院薬学研究科創薬コアラボ保有化合物ライブラリー約 6000 化合物をレポーター遺伝子アッセイによりスクリーニングした。スクリーニングは、HIF-1 結合 DNA 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として導入したヒト線維芽肉腫細胞 HT1080 細胞(HRE-Luc HT1080)を用いて行った。各ヒット化合物のルシフェラーゼ阻害による偽陽性については、*in vitro* のルシフェラーゼ活性阻害試験によって検討し、排除した。スクリーニングの結果、既存の HIF-1 α 阻害剤である YC-1 (HRE-Luc : IC₅₀ = 48.4 μ M)よりも強い HIF-1 阻害活性を示し、HIF-1 阻害剤として新しいケモタイプである 1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する CLB-016 (HRE-Luc : IC₅₀ = 19.1 μ M)を見出した(Figure 1)。

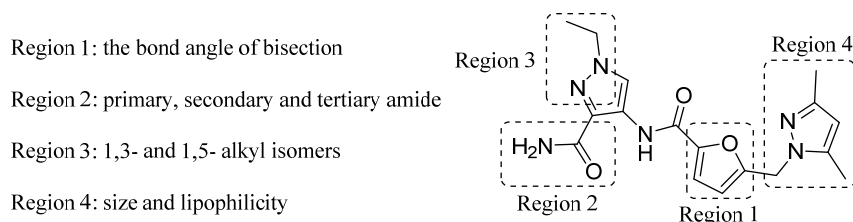


Figure 1. Chemical structure of CLB-016 and design of its derivatives.

第二章 CLB-016 の HIF-1 阻害活性における構造活性相関解析

CLB-016 の構造を 4 つの領域(Region1-4)に分け、HRE-Luc HT1080 を用いたレポーター遺伝子アッセイにより構造活性相関を検討した(Figure 1)。まず、化合物の中心に位置するフラン環の 2 位と 5 位の置換基間の角度を検討するため、フラン環をチオフェンとベンゼンに変換したところ、いずれも活性が減弱した(Region 1)。続いて、カルボキサミド部を第一級アミドから第二級アミドへ変換したところ活性は保持したが、第三級アミドでは活性が減弱した(Region 2)。さらに、主要骨格である 1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド部を位置異性体である 1-アルキルピラゾー

ル-5-カルボキサミドへ変換した OPK-143 は、HIF-1 阻害活性がほぼ完全に消失した (HRE-Luc : $IC_{50} > 100 \mu M$) (Figure 2)。この両異性体の安定配座を DFT 計算にて比較したところ、カルボキサミド部のコンフォメーションや化合物の双極子モーメントが大きく異なっていた (Region 3)。最後にジメチルピラゾール部 (Region 4) を検討したところ、ハロゲンの導入が活性向上に効果的であることを見出し、CLB-016 より HIF-1 阻害活性が向上した OPK-100 (HRE-Luc : $IC_{50} = 8.1 \mu M$) および OPK-102 (HRE-Luc : $IC_{50} = 8.7 \mu M$) を創出した (Figure 2)。

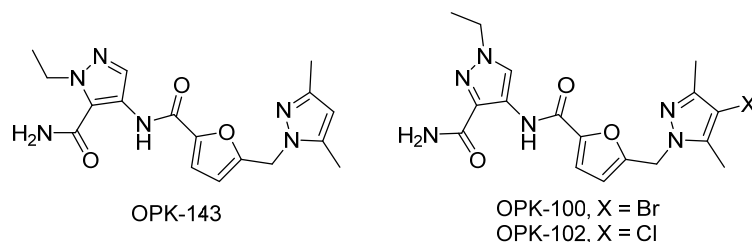


Figure 2. Chemical structure of **OPK-143**, **100** and **102**.

第三章 CLB-016およびその誘導体のHIF-1阻害機構の解析

CLB-016 およびその活性誘導体（以下、本化合物）による HIF-1 阻害の作用点解析を行った。定量 PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて、本化合物の HIF-1 α の mRNA およびタンパク質発現に対する影響を検討した結果、いずれの化合物も影響しなかった。また、最も高活性な OPK-100 で処理した HT1080 細胞の HIF-1 α は、コントロールと同様に核内に局在していたことから、CLB-016 誘導体は HIF-1 α の細胞内局在には影響を及ぼさないことが確認された。さらに、本化合物は HIF-1 の低酸素応答 cis 領域(5'-RCGTG-3')への結合能に対しても影響を及ぼさなかった。以上の結果より、本化合物は HIF-1 と転写共役因子との相互作用に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

結語

本研究にて、著者は、1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する化合物を HIF 阻害剤として創製した。本化合物は既存の HIF-1 阻害剤とは異なるケモタイプである。また、作用点解析を行い、本薬剤が核内において HIF-1 標的遺伝子の転写促進段階で作用している可能性が考えられた。これまでに報告されている HIF-1 阻害剤の作用点は、PI3K や mTOR による翻訳段階の阻害、HIF-1 の DNA 結合阻害、FIH (factor-inhibiting-HIF) の活性化による HIF-1 と転写共役因子 p300/CBP との結合阻害などが知られているが、本化合物はこれらの作用点とは異なる可能性が示唆された。本化合物の HIF-1 阻害機構の詳細な解析は必要であるものの、1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド誘導体が新しい作用点を持った HIF-1 阻害剤として機能し得る可能性が考えられる。HIF-1 阻害剤である YC-1 により放射線治療後のがんの再発を抑制した報告例もあり、既存の HIF 阻害剤とは作用点異なる本化合物をリードとした新しい抗腫瘍薬の開発が期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

著者は、HIFを分子標的とした抗がん剤開発に関する医薬品化学研究において、1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有する新規化合物をHIF-1阻害剤として創製した。

すなわち、著者は、本学研究科創薬コアラボ化合物ライブラリーより、ヘテロ芳香環を起点として65化合物を抽出し、HIF-1阻害試験および偽陽性の排除を行うことで、既存のHIF-1阻害剤とは異なる新たなケモタイプである1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミドを有するCLB-016を見出した。

さらに、著者は、CLB-016の構造活性相関研究を行った結果、HIF-1阻害活性発現には、①1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド骨格、②フラン環によるコンフォメーション制御、③右セグメントの大きさと脂溶性置換基の存在が重要であることを明らかにし、CLB-016よりもHIF-1阻害活性が増強したOPK-100、102を創製した。

最後に、著者は、既存のHIF-1阻害剤とは異なったケモタイプである本化合物群は、*general*に遺伝子発現を阻害することなくHIF-1標的遺伝子*CAIX*の転写を阻害することを明らかにした。詳細な作用機構解析の結果、本化合物が転写共役因子との相互作用への影響などHIF-1標的遺伝子の転写促進段階で作用している可能性を示した。さらに、ヒトがん細胞パネル感受性試験の結果、COMPAREに収録されている既存の抗癌剤等とも相関が認められなかったことから、CLB-016およびその活性誘導体は新規な作用機序を有することが示唆された。現在までに報告されているHIF-1阻害剤の作用点は、PI3KやmTORによる翻訳段階の阻害、HIF-1のDNA 結合阻害、FIH (factor-inhibiting-HIF)の活性化によるHIF-1と転写共役因子p300/CBPとの結合阻害などであるが、CLB-016およびその活性誘導体はこれらの作用点とは異なる可能性が示唆された。

以上のように、著者は、新規 HIF-1 阻害薬開発を目的に、化合物ライブラリーを用いた探索、構造活性相関研究、ならびに作用機序に関する研究を実施した結果、新規1-アルキルピラゾール-3-カルボキサミド誘導体が新しい作用点を持った HIF-1 阻害剤として機能し得る可能性を示した。これらの研究は、今後の分子標的抗がん剤開発、特に HIF 阻害剤開発に関して、創薬化学的にも有益な知見を与えるものと判断される。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月27日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。